

УДК 612.015.32:547.837.7

УСТОЙЧИВОСТЬ К НАРКОТИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ЭТАНОЛА И СИНТЕЗ АЦЕТИЛХОЛИНА В СИНАПТОСОМАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Ю.В. Киселевский, Н.А. Оганесян

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Настоящее исследование посвящено изучению состояния синапсомального биосинтеза ацетилхолина в мозге крыс с различной биологически детерминированной чувствительностью к наркотическому действию этанола

Ключевые слова: ферменты обмена ацетил-КоА, ацетилхолин, метаболизм, мозг, устойчивость к наркотическому действию этанола, этанол

The present study was undertaken to investigate synaptosomal biosynthesis of acetylcholine (ACh) in the brain of rats with different biologically-determined sensitivity to hypnotic action of ethanol.

Key words: Enzymes of acetyl-CoA metabolism, acetylcholine, brain, resistance to hypnotic action of ethanol, ethanol

Введение

Развитие устойчивости к действию наркотических веществ является ранним симптомом формирования зависимости и сопровождается комплексом адаптивных изменений на молекулярном, клеточном, тканевом уровне и на уровне организма в целом [24]. Так, злоупотребление этиловым алкоголем приводит к развитию устойчивости (толерантности) организма к его наркотическому действию, что является признаком начального этапа алкоголизма [23]. Установлено, что животные, отличающиеся более высоким уровнем потребления этанола в условиях свободного выбора, имеют изначально более высокую толерантность к наркотическому, анальгетическому, гипотермическому эффектам этанола. Биологически детерминированная толерантность в данном случае сочетается с генетической предрасположенностью к развитию алкоголизма, что подтверждено рядом экспериментальных исследований, как на беспородных крысах, так и на животных инбредных и селективно выведенных линий [3, 24].

Изменение соотношения между активностью возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем является наиболее значимым нейроадаптивным процессом среди индуцируемых потреблением этанола [10]. Активность холинергической системы мозга, которая определяет реакцию организма на окружение, механизмы памяти и поведения, способность к обучению – одна из важнейших составляющих нейрохимического компонента алкогольной толерантности [2, 12].

Хроническое потребление этанола приводит к

выраженным нарушениям механизмов памяти, связанных с уменьшением количества холинергических нейронов в переднем мозге [5]. Дегенеративные изменения в центральной нервной системе под действием этанола протекают параллельно со снижением основных параметров холинергической системы (синтез, содержание и высвобождение ацетилхолина (АХ)) в неокортексе и гиппокампе крыс [8]. Отмечается наличие определенной взаимосвязи между предпочтением этанола животными и уровнем АХ, активностью ферментов его биосинтеза и деградации в ЦНС, а также состоянием ацетилхолиновых рецепторов [7, 17, 18].

Таким образом, можно предположить наличие этиопатогенетической взаимосвязи между интенсивностью биосинтеза АХ в мозге и устойчивостью организма к наркотическому действию этанола. Ацетил-КоА, образующийся из пирувата в пируватдегидрогеназной реакции, является основным источником ацетильных групп для биосинтеза АХ в мозге. Активность пируватдегидрогеназы, скорость утилизации пирувата и синтез ацетил-КоА, а также транспорт ацетил-КоА в цитозоль являются лимитирующими звеньями в образовании АХ [18].

По-видимому, особенности обмена ацетильной группы АХ в мозге крыс с биологически обусловленной толерантностью к этанолу могут являться предрасполагающим метаболическим фактором развития экспериментального алкоголизма.

Целью настоящего исследования являлось выяснение особенностей функционирования системы биосинтеза АХ в мозге животных с биологи-

Ю.В. КИСЕЛЕВСКИЙ - кандидат медицинских наук, доцент кафедры реаниматологии и анестезиологии с курсом клинической биохимии, врач высшей квалификационной категории по лабораторной диагностике, заведующий отделением клинической лабораторной диагностики УЗ «ГКО «СМП» г. Гродно
Н.А. ОГАНЕСЯН - кандидат медицинских наук, ассистент кафедры реаниматологии и анестезиологии с курсом клинической биохимии, врач первой квалификационной категории по неврологии.

чески детерминированной алкогольной толерантностью. Для достижения намеченной цели изучали активность пируватдегидрогеназы, ацетил-КоА синтетазы, АТФ-зависимой цитратлиазы в гомогенатах регионов головного мозга с различной плотностью холинергических нейронов, а также скорость окисления пирувата и синтеза цитрата, содержание ацетил-КоА и скорость синтеза АХ в синапсоммах коры головного мозга крыс с биологически детерминированной толерантностью к наркотическому действию этанола.

Материалы и методы

Работа выполнялась на базе курса клинической биохимии и лаборатории аналитической биохимии Гродненского государственного медицинского университета, а также на базе кафедры фармакологии Ягелонского университета, кафедры клинической биохимии Гданьской медицинской академии.

Работа выполнялась на следующем оборудовании: спектрофотометр РV фирмы СОЛАР, люминометр фирмы LKB Pharmacia, ультрацентрифуга.

В экспериментах были использованы белые крысы-самцы линии Wistar с массой 100-120 г, отобранные по признаку длительности этанол-индуцированного сна (4,5 г/кг, 20% раствор, внутрибрюшинно). В группу короткоспящих животных (КС) были включены крысы с длительностью сна 55±11 мин, группу длительноспящих (ДС) животных составили крысы с длительностью сна 220±8 минут.

Через 2 недели после тестирования крыс ДС и КС групп декапитировали, мозг немедленно извлекали и изолировали регионы с различной плотностью холинергических нейронов (гипоталамус, стриатум, лобная кора, продолговатый мозг, боковая кора). В гомогенатах отделов мозга определяли активность пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1), ацетил-КоА синтетазы (КФ 6.2.1.1), АТФ-зависимой цитратлиазы (КФ 4.1.3.8), ацетилхолинтрансферазы (КФ 2.3.1.6), ацетилкарнитинтрансферазы (КФ 2.3.1.7) [19, 20].

Синапсомальную фракцию из коры головного мозга крыс выделяли с использованием метода дифференциального центрифугирования в градиенте фикола и сахарозы. Синапсомальную взвесь, содержащую 2,5-3 мг белка, инкубировали в течение 30 мин при 37°C в среде объемом 2 мл, содержащей 2,5 мМ натриевой соли L-малата и пирувата. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 20% HClO₄. Содержание пирувата, цитрата, уровень ацетил-КоА и концентрацию АХ определяли в депротеинизированных образцах энзиматически [4, 21].

Результаты и обсуждение

В таблице 1 приведены данные об активности пируватдегидрогеназы, ацетил-КоА синтетазы,

АТФ-зависимой цитратлиазы, ацетилкарнитинтрансферазы, ацетилхолинтрансферазы в регионах головного мозга КС и ДС крыс с различной плотностью холинергических нейронов.

Максимальная активность пируватдегидрогеназы у ДС крыс отмечалась в коре и стриатуме, наименьшая в продолговатом мозге. В то же время у КС животных максимальная активность этого фермента наблюдалась в коре мозга и гипоталамусе, наименьшая - в стриатуме и продолговатом мозге.

Активность пируватдегидрогеназы в лобной коре, боковой коре, стриатуме короткоспящих крыс была на 45%, 41% и 84% соответственно ниже по сравнению с аналогичными регионами мозга долгоспящих животных. Ранее было продемонстрировано подобная закономерность для активности пируватдегидрогеназы печени [1]. В остальных регионах не установлено различия между группами в активности этого фермента.

Наибольшая активность ацетил-КоА синтетазы у ДС, как и у КС животных была обнаружена в продолговатом мозге. Активность ацетил-КоА синтетазы была статистически выше в лобной коре короткоспящих крыс (табл. 1) по сравнению с длительноспящими. Полученные нами результаты по взаимоотношению активностей пируватдегидрогеназы и ацетил-КоА синтетазы соответствуют теории «двууглеродного голода» у крыс, предпочитающих этанол в условиях свободного выбора, предложенной Островским Ю.М. [3]. Согласно этой теории недостаток двууглеродных групп является одной из предпосылок предпочтительного отношения к этанолу как дополнительному источнику ацетильных остатков. В такой ситуации низкая активность главного источника ацетил-КоА в мозге – пируватдегидрогеназы, вероятно, компенсируется более высокой активностью ацетил-КоА синтетазного пути.

Активностью АТФ-цитратлиазы в отдельных структурах головного мозга крыс с различной био-

Таблица 1. Активность ферментов обмена ацетил-КоА и ацетилхолина (нмоль/мин/мг белка) в различных регионах головного мозга крыс, отличающихся по наркотическому эффекту этанола (M ± SD, n=9)

Фермент		Б.К.	Л.К.	Стр.	Гт.	П.М.
ПДГ	ДС	26,5±1,8	26,1±1,5	24,6±2,0	20,2±2,4	15,8±0,9
	КС	20,8±1,2*	20,4±1,3*	13,1±1,4*	18,8±1,1	16,0±1,3
АцКоА-синтетаза	ДС	4,0±0,2	3,4±0,1	2,7±0,2	4,0±0,2	5,4±0,2
	КС	3,8±0,2	4,1±0,2*	2,6±0,2	3,8±0,2	5,8±0,4
АТФ-ЦЛ	ДС	6,8±0,4	7,7±0,4	7,3±0,3	10,3±0,6	13,7±0,6
	КС	7,6±0,5	8,1±0,4	8,1±0,2*	8,9±0,4*	8,8±0,5*
АцКТ	ДС	24,8±1,3	24,1±1,7	23,5±1,4	31,2±1,9	31,3±2,5
	КС	24,4±1,6	26,0±1,8	24,2±0,9	36,9±0,9*	36,1±1,1*
ХАТ	ДС	0,51±0,03	0,6±0,03	1,35±0,11	0,69±0,1	0,82±0,06
	КС	0,55±0,03	0,62±0,06	1,3±0,1	0,5±0,02*	0,86±0,04

Примечание: БК – боковая кора, ЛК – лобная кора, Стр – стриатум, Гт – гипоталамус, ПМ – продолговатый мозг, ПДГ – пируватдегидрогеназа, АТФ-ЦЛ – АТФ-цитратлиаза, АцКТ – ацетилкарнитинтрансфераза, ХАТ – холинацетилтрансфераза. * – p < 0,05 по сравнению с группой ДС животных

логически детерминированной устойчивостью к наркотическому действию этанола характеризуется следующими особенностями: у КС крыс активность данного фермента одинакова во всех исследованных регионах. В тоже время у ДС животных активность АТФ цитратлиазы значительно варьирует и различается более чем в два раза между боковой корой (отдел с наименьшей активностью) и продолговатым мозгом (отдел с наибольшей активностью). Следует отметить, что в гипоталамусе и продолговатом мозге КС крыс активность АТФ-цитратлиазы была ниже по сравнению с аналогичными отделами мозга ДС крыс. Тогда как в стриатуме наблюдалась противоположная картина.

Максимальная активность ацетилкарнитинтрансферазы у ДС и КС крыс отмечалась в гипоталамусе и продолговатом мозге. В этих же регионах мозга КС животных активность фермента была выше, чем у крыс ДС группы. Выявленные различия у КС и ДС животных в активности АТФ-цитратлиазы и ацетилкарнитинтрансферазы длительноспящих животных может свидетельствовать о преобладании различных механизмов транспорта ацетил-КоА в цитоплазму у этих групп животных в отдельных регионах мозга.

Максимальная активность ацетилхолинтрансферазы у ДС и КС животных обнаружена в стриатуме. В гипоталамусе ДС крыс активность данного фермента была выше по сравнению с КС животными.

Задачей экспериментов *in vitro* с использованием нервных окончаний являлось оценка эффективности синапсомального биосинтеза АХ у животных экспериментальных групп.

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что скорость окисления пирувата синапсосомами коры мозга длительноспящих животных была достоверно выше (на 54%) по сравнению с группой короткоспящих крыс (табл. 2). Данный факт может быть обусловлен более низкой активностью пируватдегидрогеназы, обнаруженной в гомогенатах коры мозга животных с низкой чувствительностью к наркотическому эффекту этанола (табл. 1). Это подтверждает более низкий синаптический уровень ацетил-КоА у КС животных. Поскольку в скорости образования цитрата синапсосомами, активности АТФ-цитратлиазы и ацетилкарнитинтрансферазы коры мозга различия между группами выявлено не было, то, вероятно, активность систем транспорта ацетильного остатка из митохондрий в цитоплазму не является лимитирующим для синтеза ацетилхолина нервными окончаниями экспериментальных животных.

Присутствие в среде инкубации 0,1 мМ Ca^{2+} приводило к ингибированию утилизации пирувата и синтеза цитрата синапсосомами животных

Таблица 2. Скорость окисления пирувата, скорость образования цитрата, концентрация ацетил-КоА, скорость синтеза ацетилхолина в синапсосомах коры головного мозга крыс с различной биологической толерантностью (КС, ДС) к этанолу (N = 7)

Условия инкубации	КС		ДС	
	Скорость окисления пирувата, нмоль/мг белка/мин		Скорость образования цитрата, нмоль/мг белка/мин	
П + М	10,77 ± 2,7*		17,48 ± 7,1	
(П + М) + Ca^{2+}	6,85 ± 1,9* ^o		10,85 ± 3,7 ^o	
	Скорость образования цитрата, нмоль/мг белка/мин		Содержание ацетил-КоА, нмоль/мг белка	
П + М	2,56 ± 1,8		2,8 ± 1,63	
(П + М) + Ca^{2+}	0,53 ± 0,2 ^o		0,75 ± 0,4 ^o	
	Скорость синтеза ацетилхолина, нмоль/мг белка/мин		Содержание ацетилхолина, нмоль/мг белка/мин	
П + М	6,2 ± 1,14*		15,8 ± 4,2	
(П + М) + Ca^{2+}	13,6 ± 6,4* ^o		25,3 ± 5,1 ^o	

Примечание: П - 2,5 мМ пируват натрия, М - 2,5 мМ L-малат натрия, Ca^{2+} - 0,1 мМ * - статистически значимая разница в отношении ДС крыс ($P < 0,05$); ^o - статистически значимая разница в отношении аналогичной группы, без добавления в среду ионов Ca^{2+} ($P < 0,05$).

обеих экспериментальных групп в равной степени на фоне почти двукратной стимуляции синтеза ацетилхолина. Хотя в ряде работ была показана прямая связь между уровнем окисления пирувата и скоростью синтеза ацетилхолина [9], однако другими исследователями продемонстрировано ингибирование окисления пирувата на фоне стимуляции синтеза ацетилхолина синапсосомами при добавлении в среду ионов кальция [22]. Данный феномен до сих пор не нашел удовлетворительного объяснения. Одни связывают его с ингибирующим эффектом внемитохондриального кальция в концентрациях более 10^{-6} М на активность пируватдегидрогеназного комплекса митохондрий коры мозга [14]. Однако другими исследователями показано увеличение активности пируватдегидрогеназного комплекса в процессе деполяризации, что связывают со снижением степени фосфорилирования комплекса [6]. Еще одна группа исследователей не обнаружила активирующего действия кальция и магния на пируватдегидрогеназу митохондрий мозга в отличие от того же фермента из митохондрий печени [13].

Еще одним объяснением ингибирующего действия ионов кальция на уровень окисления пирувата может быть нарушение транспорта пирувата через мембрану синапсомальных митохондрий. Такой эффект кальция был показан для митохондриальных гепатоцитов [11].

Синапсосомы КС крыс отличались более низкой скоростью синтеза ацетилхолина по сравнению с ДС животными. Данный факт подтверждает выявленную ранее зависимость между концентрацией ацетил-КоА и уровнем синтеза ацетилхолина в синапсосомах [16].

Добавление в среду инкубации синапсосом ионов кальция приводило к выраженной стимуляции скорости синтеза ацетилхолина у животных обеих групп. Причем различие между группами по данному показателю сохранялось. Однако степень кальций стимулированного прироста скорости син-

теза ацетилхолина у короткоспящих крыс была на 80% выше по сравнению с длительноспящими животными (табл. 1). Данный эффект может быть обусловлен повышенной чувствительностью синапсов короткоспящих крыс к эффектам кальция [15].

Таким образом, изначально низкая скорость синтеза АХ у КС животных, по-видимому, обусловлена меньшей эффективностью синаптосомальной системы окисления пирувата в синаптосомах мозга.

В статье использован экспериментальный материал, полученный при выполнении научных работ в рамках гранта БрФФИ Б03-176.

Литература

1. Алкоголь и углеводы / Островский Ю.М., Сатановская В.И., Островский С.Ю., и др. // Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя. - Мн.: Наука и техника, 1988. - С. 43-86.
2. Нейрохимические основы толерантности к этанолу / Чумакова О.В. Сатановская В.И. Ковальчук В.Г. и соавт. // Тез. докл. V Всероссийского съезда невропатологов и психиатров. - Иркутск, 1985. - №4. - С. 144-146.
3. Островский Ю.М., Сатановская В.И., Садовник М.Н. Биологический компонент в генезе алкоголизма. - Минск, 1986.
4. Bielarczyk H., Szutowicz A. Evidence for the regulatory function of synaptoplasmic acetyl-CoA in acetylcholine synthesis in nerve endings // *Biochem. J.* - 1989. - Vol. 262. - P. 377-380.
5. Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain transplants, and excitotoxic lesions of the cholinergic basal forebrain projection system / Arendt T., Allen Y., Marchbanks R.M. at al. // *Neuroscience.* - 1989. - Vol. 33. - P. 435-462.
6. Cain S.T., Routtenberg A. Phosphorylation of pyruvate dehydrogenases in the hippocampal slice: time course of response to cellular depolarization // *Neurosci. Lett.* - 1991. - Vol. 130. - P. 65-68.
7. Carroll P.T. Evidence to suggest that extracellular acetate is accumulated by rat hippocampal cholinergic nerve terminals for acetylcholine formation and release // *Brain Res.* - 1997. - Vol. 753, N 1. - P. 47-55.
8. Degeneration of rat cholinergic basal forebrain neurons and reactive changes in nerve growth factor expression after chronic neurotoxic injury - I. Degeneration and plastic response of basal forebrain neurons / Arendt T., Bruckner M.K., Pagliusi S. at al. // *Neuroscience.* - 1995. - Vol. 65, N 3. - P. 633-645.
9. Dolezal V, Tucek S Utilization of citrate, acetylcarnitine, acetate, pyruvate and glucose for the synthesis of acetylcholine in rat brain slices // *J. Neurochem.* - 1981. - Vol. 4. - P. 1323-1330.
10. Fadda F., Rossetti Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration // *Prog. Neurobiol.* - 1998. - Vol. 56, N 4. - P. 385 - 431.
11. Folders M., Barrit J.B. Regulation by calcium ions of pyruvate carboxylation, pyruvate transport and adenine nucleotide transport in isolated rat liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* - 1977. - Vol. 15. - P. 5372-5380.
12. Ho A.K.S., Kissin B. Evidence of a control cholinergic role in alcohol preference // In: *Alcohol intoxication and Withdrawal* // New York-London: Plenum Press. - 1975. - P. 303 - 310
13. Jope R., Blass J.P. A comparison of the pyruvate dehydrogenases in mitochondria from rat brain and liver // *Biochem. J.* - 1975. - Vol. 150 - P. 397-403.
14. Lai J.C.K., DiLorenzo J. C., Sheu K.F.R. Pyruvate dehydrogenase complex is inhibited in calcium loaded cerebrocortical mitochondria // *Neurochem. Res.* - 1988. - Vol. 13. - P. 1043-1048.
15. Lynch M., Littleton J.M.. Possible association of alcohol tolerance with increase synaptic Ca²⁺ sensitivity // *Nature.* - 1983. - Vol. 303. - P. 175-177.
16. Pathways of beta-hydroxybutyrate contribution to metabolism of acetyl-CoA and acetylcholine in rat brain nerve terminals / Tomaszewicz M., Bielarczyk H., Jankowska A., Szutowicz A. // *Folia Neuropathol.* - 1997. - Vol. 35. - P. 244-246.
17. Responses to cholinergic agonists of rats selectively bred for differential sensitivity to ethanol / Fiebre C.M., Romm E., Collins J.T. at al. // *Alcoholism Clin. and Exp. Res.* - 1991. - Vol. 35, N 2 - P. 270 - 276, 12.
18. Szutowicz A., Tomaszewicz M., Bielarczyk H. Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies // *Acta Neurobiol. Exp.* - 1996. - Vol. 56, N 1. - P. 323 - 339
19. Szutowicz A., Lysiak W. Regional and subcellular distribution of ATP-citratylase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain // *J. Neurochem.* - 1980. - Vol. 35. - P. 775-785.
20. Szutowicz A., Stepien M., Piec G. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citratsynthetase // *Analyt. Biochem.* - 1981. - Vol. 115. - P. 81 - 87.
21. Szutowicz A., Bielarczyk H., Elimination of CoASH interferences from acetyl-CoA cycling assay by maleic anhydride // *Analyt. Biochem.* - 1987. - Vol. 164. - P. 292 - 296.
22. Szutowicz A, Tomaszewicz M, Bielarczyk H. Key role of acetyl-CoA in cytoplasm of nerve terminals in disturbances of acetylcholine metabolism in brain // *Folia Neuropathol.* - 1997. - Vol. 4. - P. 241-243.
23. Tabakoff B. Melhior C. Hoffman P. Commentary on ethanol tolerance // *Alcoholism: Clin. and Exp. Res.* - 1982. - V. 6, № 2. - P 583-587.
24. Tabakoff B., Hoffman P.L. Tolerance and the etiology of alcoholism: Hypothesis and mechanism // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* - 1988. - Vol. 12, N 1. - P. 184 - 186.

Resume

RESISTANCE TO HYPNOTIC ACTION OF ETHANOL AND SYNAPTOSOMAL BIOSYNTHESIS OF ACETYLCHOLINE IN BRAIN OF RATS

Yu.W. Kiselevski, N. A. Oganesyana
Grodno State Medical University

The present study is aimed at investigation of acetyl-group acetylcholine metabolism rate in rat brain with different biological sensitivity to ethanol hypnotic action. The activity of pyruvate dehydrogenase (PD), acetyl-CoA synthetase (AS), ATP-citrate lyase (CL), acetylcarnitintransferase (ACT), Cholinacetyltransferase (ChAT) in five regions of rat brain with different periods of alcohol-induced hypnosis (short-sleep (SS), long sleep (LS)) was investigated. The main stages of acetylcholine biosynthesis (pyruvate utilization, citrate synthesis, acetyl-CoA rate and acetylcholine synthesis) in synaptosomes isolated from rat brain in SS and LS animals were assessed as well. It was established that the activity of PD in brain cortex striatum of LS rats is higher than that in similar regions of SS animals, the activity of AS in SS animals being higher than that in LS animals. The pyruvate utilization rate, the level of acetyl-CoA and acetylcholine synthesis were found to be statistically higher in LS rat synaptosomes as compared to similar indices in SS animals. On the basis of the obtained data it was suggested that SS animals showed slower activity of acetyl group synthesis from pyruvate for synaptosomal acetylcholine biosynthesis.